



(19) **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

(12) **Patentschrift**
(10) **DE 197 16 346 C 1**

(5) Int. Cl.⁶:
C 07 H 21/04
C 07 H 21/00
C 12 Q 1/68

(21) Aktenzeichen: 197 16 346.7-44
(22) Anmeldetag: 18. 4. 97
(43) Offenlegungstag: -
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 19. 11. 98

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

(73) **Patentinhaber:**
Wagener, Christoph, Prof. Dr., 20251 Hamburg, DE

(74) **Vertreter:**
Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea
Schüßler, 81825 München

(72) **Erfinder:**
Wagener, Christoph, Prof. Dr., 20251 Hamburg, DE;
Neumaier, Michael, Prof. Dr., 20251 Hamburg, DE;
Tschentscher, Peter, Dr., 20251 Hamburg, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
WO 96 17 080 A1
Gene 159 (1995) 43-47;

(54) **Verfahren zum Nachweis von Cytokeratinen**
(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum
Nachweis von Cytokeratinen, umfassend die folgenden
Schritte:
a) Entnahme und Aufbereitung einer Körperprobe,
b) Isolierung von mRNA aus der Körperprobe,
c) Übersetzung der mRNA in cDNA durch eine reverse
Transkription,
d) Amplifikation der cDNA durch eine PCR mit Primern,
die eine größere Affinität zur cDNA von Cytokeratinen als
zu prozessierten Cytokeratin-Pseudogenen aufweisen,
und
e) Nachweis der amplifizierten cDNA.
Ferner betrifft die Erfindung Primer zur Durchführung des
Verfahrens sowie einen Kit.

DE 197 16 346 C 1

DE 197 16 346 C 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Cytokeratin 18 (CK18) mittels Polymerasekettenreaktion und hierzu verwendbare Primer sowie einen Nachweis-Kit.

Cytokeratine sind eine Gruppe von Keratin-ähnlichen Filamenten. Unter ihnen hat insbesondere Cytokeratin 18 (nachstehend mit CK18 bezeichnet) eine große Bedeutung erlangt, da es zum Nachweis von aus Epithelzellen hervorgegangenen Tumoren verwendet werden kann. Zu diesem Nachweis werden z. B. immunologische Verfahren durchgeführt, in denen Antikörper gegen CK18 eingesetzt werden. Solche Verfahren sind jedoch wenig sensitiv. Andererseits wird CK18 auch auf Nukleinsäureebene nachgewiesen. Hierzu wird CK18-mRNA mittels reverser Transkription in cDNA übersetzt und diese in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und dann nachgewiesen. Ein solches mit RT-PCR bezeichnetes Verfahren führt allerdings oft zu falsch positiven Ergebnissen. Seine Spezifität ist daher unbefriedigend.

Neumaier et al., *Gene* 159 (1995), S. 43-47 beschreiben die Diagnose von Mikrometastasen durch die Amplifikation von gewebe-spezifischen Genen. Dies erfolgt beispielsweise durch Amplifikation von CK-18 bzw. CEA in einer Polymerase-Ketten-Reaktion.

WO 96/17080 betrifft den Nachweis von Tumoren über die Expression von Cytokeratin 20.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem CK18, sensitiv und spezifisch nachgewiesen werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zum Nachweis von CK18 das die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Entnahme und Aufbereitung einer Körperprobe,
- b) Isolierung von mRNA aus der Körperprobe,
- c) Übersetzung der mRNA in cDNA durch eine reverse Transkription,
- d) Amplifikation der cDNA durch eine PCR mit speziellen nachfolgend genannten Primern, die eine größere Affinität zur cDNA von CK18 zu prozessierten CK18-Pseudogenen aufweisen, und
- e) Nachweis der amplifizierten cDNA.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß die falsch positiven Ergebnisse in einer herkömmlichen RT-PCR für CK18 durch prozessierte CK18-Pseudogene verursacht werden. Diese liegen als Verunreinigung der präparierten mRNA einer Körperprobe vor. Die prozessierten CK18-Pseudogene haben eine große Homologie zur cDNA von CK18 und werden daher in einem herkömmlichen RT-PCR-Verfahren mitamplifiziert.

Der Anmelder hat prozessierte CK18-Pseudogene isoliert. Hierzu hat er genomische DNA des Menschen isoliert und einer PCR unterzogen, in der Primer verwendet wurden, die sich auch zur Amplifikation von CK18-cDNA eignen. Die amplifizierte Pseudogen-DNA wurde kloniert und sequenziert. Drei der amplifizierten Pseudogen-DNAs sind in **Fig. 1** im Vergleich zur CK18-cDNA dargestellt. Die amplifizierten Pseudogen-DNAs wurden bei der DSM am 07. März 1997 als Klon 6, Klon 5 bzw. Klon 1 unter DSM 11448, DSM 11447 bzw. DSM 11446 hinterlegt. Sie stellen auch einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung dar.

In einem erfindungsgemäßen Verfahren wird der Unterschied zwischen der cDNA von CK18 und ihren prozessierten Pseudogenen zur Konstruktion von Primern für eine

PCR genutzt, durch die eine selektive Amplifikation der cDNA von Cytokeratinen gegenüber prozessierten Cytokeratin-Pseudogenen erhalten wird.

Ein erfindungsgemäßes Verfahren umfaßt die Entnahme einer Körperprobe und deren Aufbereitung. Als Körperprobe sind z. B. ein Abstrich, das Punktat bzw. die Biopsie eines Organs, z. B. von Knochenmark, aber auch Blut, Sputum, Urin, Stuhl, Liquor, Galle, Lympheflüssigkeit oder ein gastrointestinales Sekret, geeignet, wobei eine Knochenmarks-Biopsie oder Blut bevorzugt ist.

Die Entnahme und Aufbereitung der Körperprobe erfolgt in üblicher Weise. Ebenso wird die mRNA aus der Körperprobe nach üblichen Verfahren isoliert. Günstig ist es, das Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Verfahren zu verwenden (vgl. Chomczynski, P und Sacchi, N. *Anal. Biochem.* 162, (1987), 156-169).

Die erhaltene mRNA wird einer reversen Transkription unterzogen, wobei übliche Primer, z. B. "random hexamer" von Pharmacia, verwendet werden. Ebenso kann eine übliche reverse Transkriptase, vorzugsweise eine MMIV reverse Transkriptase (z. B. Superscript II, Gibco BRL), verwendet werden. Die Bedingungen und die Puffer der reversen Transkription erfolgen wie vom Hersteller empfohlen.

Die erhaltene cDNA wird einer PCR unterzogen, wobei es günstig ist, eine käufliche Taq-Polymerase (z. B. Gibco BRL) zu verwenden. Als Primer werden solche verwendet, die eine größere Affinität zur cDNA von Cytokeratinen als zu prozessierten Cytokeratin-Pseudogenen aufweisen. Solche Primer können durch übliche Verfahren erhalten werden. Günstig ist es wie folgt vorzugehen: Es werden Primer zu Bereichen der cDNA von Cytokeratinen, insbesondere CK18, konstruiert, in denen die prozessierten Cytokeratin-Pseudogene Unterschiede aufweisen (vgl. **Fig. 2**). Die Bereitstellung von prozessierten Cytokeratin-Pseudogenen bzw. deren Sequenzen erfolgt durch übliche Verfahren. Beispielshaft wird auf die vorstehend beschriebene Bereitstellung von prozessierten CK18-Pseudogenen verwiesen. Die erhaltenen Primer werden auf ihre Affinität zur cDNA von Cytokeratinen bzw. zu prozessierten Cytokeratin-Pseudogenen getestet. Dies kann in üblichen Tests erfolgen. Beispielsweise werden die Primer in eine PCR eingesetzt, in der die cDNA von Cytokeratinen oder prozessierte Cytokeratin-Pseudogene in Form genomischer DNA enthalten sind. Die PCR kann unter üblichen Bedingungen durchgeführt werden. Es werden Primer erhalten, die eine größere Affinität zur cDNA von Cytokeratinen als zu prozessierten Cytokeratin-Pseudogenen aufweisen. Auch können die Bedingungen der PCR, wie Zeit, Temperatur, pH, Puffer, variiert werden, wodurch für jedes Primerpaar die optimalen Bedingungen ermittelt werden, unter denen es die größte Affinität zur cDNA von Cytokeratinen bzw. die kleinste Affinität zu prozessierten Cytokeratin-Pseudogenen aufweist.

Primer, die in einem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, stellen auch einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung dar.

Erfindungsgemäße Primer hinsichtlich der cDNA von CK18 sind folgende: 5'-TGCCTCACCACACAGTCTGAT-3' (X), 5'-CACCTTTGGCCATCCACTAGCC-3' (Y), 5'-TGAGGACCGCTACGCTTA-3' (X') und 5'-CCAAAGGCATACCAAGACTA-3' (Y'). Die Position der Primer ist in **Fig. 1** angegeben. Die Primer X und X' können als "upper" Primer und Y und Y' als "lower" Primer eingesetzt werden. Besonders bevorzugt sind die Primerpaare X und Y sowie X' und Y'.

Zur Durchführung der PCR in einem erfindungsgemäßen Verfahren können übliche Bedingungen eingehalten werden. Vorzugsweise umfaßt der PCR-Reaktionsansatz 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂,

0,01% Gelatine, 0,25 mM jedes dNTP, 0,4–0,8 µM Primer und 5 Einheiten Taq-Polymerase pro 100 µl.

Die PCR umfaßt pro Zyklus vorzugsweise folgendes: Eine Denaturierung der DNA bei 90 bis 100°C, während 40 bis 60 Sekunden, insbesondere bei 95°C, während 50 Sekunden. Ferner eine Hybridisierung der Primer bei 40 bis 60°C, während 20 bis 40 Sekunden, insbesondere bei 54°C, während 30 Sekunden.

Desweiteren kann die PCR-Reaktion eine initiale Denaturierung bei 90 bis 100°C, während 1 bis 2 Minuten, insbesondere bei 95°C, während 80 Sekunden und eine abschließende Extension bei 65 bis 75°C, während 30 bis 90 Sekunden, insbesondere bei 72°C, während 1 Minute umfassen.

Die Anzahl der Zyklen in der PCR kann von einem Fachmann leicht ermittelt werden. Sie kann vom Gewebe abhängig sein, aus dem die mRNA stammt. Vorzugsweise trägt die Anzahl der Zyklen 20 bis 100, wobei ca. 30 bis 70 Zyklen für mRNA aus Blut und 40 bis 80 Zyklen für mRNA aus Knochenmark besonders bevorzugt sind.

Günstig kann es sein, wenn in der PCR zwei unterschiedliche Primerpaare verwendet werden, wobei das zweite Primerpaar "nested" Primer sind, so daß hiernüt ein kleineres DNA-Stück innerhalb des amplifizierten DNA-Stücks der ersten PCR amplifiziert wird. Vorzugsweise umfaßt eine solche PCR-Reaktion folgendes:

erste PCR: Primer X und Y, ca. 40 Zyklen bei 90 bis 100°C, während 40 bis 60 Sekunden, insbesondere 95°C, während 50 Sekunden, und 40 bis 60°C, während 20 bis 40 Sekunden, insbesondere 54°C, während 30 Sekunden.

Ein Aliquot der ersten PCR wird mit dem Ansatz für die zweite PCR verdünnt, z. B. 1 : 10¹ : 20.

zweite PCR: Primer X' und Y', 25 bis 40 Zyklen unter den Bedingungen der ersten PCR.

Jede PCR kann mit einer initialen Denaturierung gestartet und mit einer abschließenden Extension unter jeweils vorstehenden Bedingungen beendet werden.

Der Nachweis der amplifizierten Cytokeratin-cDNA erfolgt in üblicher Weise, z. B. durch Agarosegel-Elektrophorese mit Ethidiumbromid unter UV-Licht oder durch Southern-Blot-Hybridisierung mit für die Cytokeratin-cDNA spezifischen Sonden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zum Nachweis von CK18 in einer Körperprobe. Dieser Kit umfaßt Mittel zur Übersetzung von mRNA in cDNA, Primer für eine PCR, Reagenzien, Lösungen, Puffer und Enzyme sowie Mittel zum Nachweis von amplifizierter DNA.

Er umfaßt als Primer die vorstehenden Primer X, Y und/oder X', Y'.

Die vorliegende Erfindung weist eine Reihe von Vorteilen auf. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können geringste Mengen von CK18-RNA nachgewiesen werden. Beispielsweise ist es bei CK18-RNA möglich, Mengen nachzuweisen, die auf das Vorliegen von 1–10 Epithelzellen pro Milliliter Blut schließen lassen. Das erfindungsgemäße Verfahren ist somit sehr sensitiv. Ferner werden bei ihm keine falsch positiven Ergebnisse erhalten. Es ist somit auch sehr spezifisch. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich daher bestens zum Nachweis von CK18.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1: zeigt die cDNA von CK18 und die DNA von drei prozessierten CK18-Pseudogenen. Unterschiede in den einzelnen DNAs sind angegeben. Ferner sind in den CK18-cDNA die Positionen der Primer X, Y, X' und Y' angegeben.

Fig. 2: zeigt einen Teilbereich der cDNA von CK18 und die entsprechenden Teilbereiche von drei prozessierten CK18-Pseudogenen sowie die Konstruktion von "upper"

und "lower" Primer, wobei Nukleotid-Substitutionen in Boxen dargestellt sind.

Fig. 3: zeigt amplifizierte cDNAs einer PCR-Reaktion (erwartete Größe der amplifizierten cDNA: 210 bp) in einer Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid-Färbung (0,5 : 10⁶ bis 10⁵ HT29-Karzinomzellen pro Milliliter peripherem Blut, N: negative Kontrolle (Wasser anstelle von Blut bei der RNA-Isolierung, H: negative Kontrolle (Wasser anstelle von RNA bei der cDNA-Synthese, B: peripheres Blut ohne Karzinomzellen).

Fig. 4: zeigt die Untersuchung von Knochenmarksproben mittels eines erfindungsgemäßen Verfahrens (Ethidiumbromid-gefärbtes Gel, H: negative Kontrolle (Wasser anstelle von RNA in der cDNA-Synthese), P: positive Kontrolle (RNA von Karzinomzellen in peripherem Blut); 1: Knochenmarkprobe eines Patienten mit nicht-maligner Erkrankung (chronische Pankreatitis); 2–6: Knochenmarksproben von Patienten mit gastrointestinalem Krebs.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Klonierung prozessierter CK18 Pseudogene

Genomische DNA wurde gemäß einem üblichen Verfahren aus Leukozyten des peripheren Bluts isoliert und mit 30 µg/ml RNase während einer Stunde bei 37 °C behandelt. Es wurde eine PCR durchgeführt, in der zur Amplifikation von CK18-Pseudogenen folgende Primer verwendet wurden: L: 5'-ATGAGATTACACAC'AC'CTCCACCT-3' und R: 5'-ATGCCCTCAGAAC'ITTTGGTGTTCATTGG-3'. Die PCR-Reaktionsbedingungen umfaßten 32 Zyklen bei 97°C (1 Minute), eine Hybridisierungstemperatur von 62°C (2 Minuten) und einen abschließenden Extensionsschritt bei 72°C (2 Minuten), gefolgt von einer Extension bei 72°C (10 Minuten). Der PCR-Ansatz erfolgte in 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 0,01% Gelatine, 0,25 mM jedes dNTP's, 0,4 µM Primer und 5 Einheiten Taq-Polymerase pro 100 µl. Die amplifizierte cDNA wurde in die Klonierungsstelle des Vektors pCR11 integriert. Erhaltene Klone wurden einer Restriktionsanalyse unterzogen. Es wurden drei Klone gefunden, welche die in **Fig. 1** dargestellten CK18-Pseudogene enthielten.

Beispiel 2: Nachweis von CK18 durch ein erfindungsgemäßes Verfahren

Zellkulturen der menschlichen Kolon-Karzinom-Zelllinie HT29 wurden trypsinisiert, pelletiert, gewaschen, in PBS resuspendiert, gezählt und in peripherem Blut von Gesunden, enthaltend 153 mg Hämoglobin und 6 × 10⁶ Leukozyten pro Milliliter Blut, seriell verdünnt (10⁵ bis 10⁰). Bei der Blutentnahme wurde darauf geachtet, keine Kontamination durch Epithelzellen der Haut zu verursachen, indem die ersten Milliliter entnommenen Blutes verworfen wurden. RNA wurde aus dem Blut bzw. den Blut-HT29-Verdünnungen in üblicher Weise mit dem Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Verfahren extrahiert. Ferner wurde die RNA-Präparation mit DNase inkubiert (40 Einheiten pro 400 µl mit 10 Einheiten RNase-Inhibitor in 5 mM MgSO₄ bei 25°C). Das Enzym wurde danach bei 90°C während 5 Minuten inaktiviert. Getrocknete RNA von 0,5 ml Blut bzw. Blut-HT29-Verdünnungen wurde in 80 µl TE resuspendiert. Diese RNA wurde einer reversen Transkription unterzogen, in der "random hexamer" Primer verwendet wurden. Es wurde cDNA erhalten. Diese wurde einer "nested" PCR unterzogen, in der "nested" Primer als zweites Primerpaar verwendet wurden. Der erste PCR-Ansatz (100 µl) umfaßte 10 µl cDNA und jeweils 0,8 µM der Primer 5'-TGC'ACAC'ACAC'AGTC'FGAT-3' (X) und 5'-

CACCTTTGCCATCCACTAGCC-3' (Y). 40 Zyklen wurden bei 95°C (50 Sekunden) und 54°C (30 Sekunden) durchgeführt. 7 µl dieses Ansatzes wurden in einen zweiten PCR-Ansatz (100 µl) gegeben, der jeweils 0,8 µM der Primer 5'-TGGAGGACCGCTACGCCCTA-3' (X') und 5'-CCAAGGCATCACC'AAGACTA-3' (Y') enthält. Ferner wurde jede PCR mit einer initialen Denaturierung von 80 Sekunden bei 95°C gestartet und mit einer abschließenden Extension während 1 Minute bei 72°C beendet. Amplifizierte cDNA wurde einer Gelelektrophorese unterzogen, um Größe und Menge der amplifizierten cDNA abzuschätzen.

Aus Fig. 3 geht hervor, daß in peripherem Blut CK18 in einer Menge nachgewiesen werden konnte, die auf 1 bis 10 Zellen der Kolonkarzinom-Zelllinie HT 29 pro Milliliter Blut schließen läßt. Ferner geht aus Fig. 3 hervor, daß im Blut von Gesunden ohne Zusatz von Epithelzellen kein CK18 nachgewiesen werden konnte.

Somit ist das erfindungsgemäße Verfahren spezifisch und sensitiv für Cytokeratine, z. B. CK18.

Beispiel 3: Nachweis von CK18 in Patientenproben

Knochenmarksproben von fünf Patienten, die an einem Tumor der Speiseröhre, des Magens oder der Lunge litten, und eines Patienten mit einer gutartigen Erkrankung (chronische Pankreatitis) wurden entnommen. Es wurde ein erfindungsgemäßes Verfahren (vgl. Beispiel 2) durchgeführt.

Aus Fig. 4 geht hervor, daß drei der fünf Tumorpatientenproben positiv für CK18 waren. Die Probe von dem an einer chronischen Pankreatitis leidenden Patienten war negativ für CK18.

Somit kann das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden, um in Patientenproben spezifisch, d. h. ohne durch genomische DNA verursachte falsch positive Ergebnisse, und sensitiv Cytokeratin, z. B. CK18, nachzuweisen.

Patentansprüche

1. Oligonukleotide der folgenden Sequenz: 5'-TGCTCACCACACAGTC'TGAT-3' (X), 5'-CACCTTTGCCATCCACTAGCC-3' (Y), 5'-TGGAGGACCGCTACGCCCTA-3' (X'), 5'-CCAAGGCATCACC'AAGACTA-3' (Y')

2. Verwendung der Oligonukleotide nach Anspruch 1 als Primer zum Nachweis von Cytokeratin 18 (CK18).

3. Verfahren zum Nachweis von Cytokeratin 18 (CK18), umfassend die folgenden Schritte:

- a) Entnahme und Aufbereitung einer Körperprobe,
- b) Isolierung von mRNA aus der Körperprobe,
- c) Übersetzung der mRNA in cDNA durch eine reverse Transkription,
- d) Amplifikation der cDNA durch eine PCR mit Primern, die eine größere Affinität zur cDNA von CK18 als zu prozessierten CK18-Pseudogenen aufweisen, und
- e) Nachweis der amplifizierten cDNA,

dadurch gekennzeichnet, daß die Primer 5'-TGCTCACCACACAGTC'TGAT-3' (X), 5'-CACCTTTGCCATCCACTAGCC-3' (Y) und/oder 5'-TGGAGGACCGCTACGCCCTA-3' (X'), 5'-CCAAGGCATCACC'AAGACTA-3' (Y') sind.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperprobe ein Abstrich, das Punkat oder die Biopsie eines Organs, z. B. von Knochenmark, oder auch Blut, Sputum, Urin, Stuhl, Liquor, Galle, Lympheflüssigkeit und/oder ein gastrointestinales Sekret ist.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Cytokeratin-Pseudogene jene von Fig. 1 sind.

6. Kit zum Nachweis von Cytokeratin 18 (CK18), umfassend Mittel zur Übersetzung von mRNA in cDNA, Primer für eine PCR, Reagenzien, Lösungen, Puffer und Enzyme sowie Mittel zum Nachweis von amplifizierter cDNA, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer 5'-TGCTCACCACACAGTC'TGAT-3' (X), 5'-CACCTTTGCCATCCACTAGCC-3' (Y) und/oder 5'-TGGAGGACCGCTACGCCCTA-3' (X'), 5'-CCAAGGCATCACC'AAGACTA-3' (Y') sind.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

cDNA	5'	ATGAGCTTCACCACTCGCTCCACCTTCTCCACCAACTACCGGTCCCTGGGCTCTGTCCAG	3'
Klon 6	5'	ATGAGCTTCACCACTCGCTCCACCTTCTCCACCAACTACCGGTCCCTGGGCTCTGTCCAG	3'
Klon 1	5'	ATGAGCTTCACCACTCGCTCCACCTTCTCCACCAACTACCGGTCCCTGGGCTCTGTCCAG	3'
Klon 5	5'	ATGAGCTTCACCACTCGCTCCACCTTCTCCACCAACTACCGGTCCCTGGGCTCTGTCCAG	3'
cDNA	5'	GCGCCAGCTACGGCGCCCGCGGTCAGCAGCGCGCCAGCGTCTATGCAGGCGCTGGG	3'
Klon 6	5'	GCGCCAGCTACGGCTCCCGCGGTCAGCAGCGCGCCAGCGTCTATGCAGGCGCGGG	3'
Klon 1	5'	ATGCCAGCTACGGTGGCCCGGTCAGCAGCGCGCCAGCGTCTATGCAGGCGCGGG	3'
Klon 5	5'	ATGCCAGCTACGGTGGCCCGGTCAGCAGCGCGCCAGCGTCTATGCAGGCGCGGG	3'
cDNA	5'	GGCTCTGGTTCCCGGATCTCCGTTCCCGCTCCACCAGCTTCAGGGCGGCATGGGGTCC	3'
Klon 6	5'	GGCTCTGGTTCCCGGATCTCCGTTCCCGCTCCACCAGCTTCAGGGCGGCATGGGGTCC	3'
Klon 1	5'	GGCTCTGGTTCCCGGATCTCCGTTCCCGCTCCACCAGCTTCAGGGCGGCATGGGGTCC	3'
Klon 5	5'	GGCTCTGGTTCCCGGATCTCCGTTCCCGCTCCACCAGCTTCAGGGCGGCATGGGGTCC	3'
cDNA	5'	GGGGCCTGCGCCACCGGGATAGCCGGGGGTCTGGCAGGAATGGGAGGCATCCAGAACCAG	3'
Klon 6	5'	GGGGCCTGCGCCACCGGGATAGCCGGGGGTCTGGCAGGAATGGGAGGCATCCAGAACCAG	3'
Klon 1	5'	GGGGCCTGCGCCACCGGGATAGCCGGGGGTCTGGCAGGAATGGGAGGCATCCAGAACCAG	3'
Klon 5	5'	GGGGCCTGCGCCACCGGGATAGCCGGGGGTCTGGCAGGAATGGGAGGCATCCAGAACCAG	3'
cDNA	5'	AAGGAGACCATGCAAAGCCTGAACGACCGCTGGCCTCTTACCTGGACAGAGTGAGGAGC	3'
Klon 6	5'	AAGGAGACCATGCAAAGCCTGAACGACCGCTGGCCTCTTACCTGGACAGAGTGAGGAGC	3'
Klon 1	5'	AAGGAGACCATGCAAAGCCTGAACGACCGCTGGCCTCTTACCTGGACAGAGTGAGGAGC	3'
Klon 5	5'	AAGGAGACCATGCAAAGCCTGAACGACCGCTGGCCTCTTACCTGGACAGAGTGAGGAGC	3'
cDNA	5'	CTGGAGACCGAGAACCAGGAGCTGGAGAGCAAAATCCGGGAGCAGCTGGAGAAGAAGGGA	3'
Klon 6	5'	CTGGAGACCGAGAACCAGGAGCTGGAGAGCAAAATCCGGGAGCAGCTGGAGAAGAAGGGA	3'
Klon 1	5'	CTGGAGACCGAGAACCAGGAGCTGGAGAGCAAAATCCGGGAGCAGCTGGAGAAGAAGGGA	3'
Klon 5	5'	CTGGAGACCGAGAACCAGGAGCTGGAGAGCAAAATCCGGGAGCAGCTGGAGAAGAAGGGA	3'
cDNA	5'	CCCCAGGTTCAGAGACTGGAGCCATTACTTCAAGATCATCGAGGACCTGAGGGCTCAGATC	3'
Klon 6	5'	CCCCAGGTTCAGAGACTGGAGCCATTACTTCAAGATCATCGAGGACCTGAGGGCTCAGATC	3'
Klon 1	5'	CCCCAGGTTCAGAGACTGGAGCCATTACTTCAAGATCATCGAGGACCTGAGGGCTCAGATC	3'
Klon 5	5'	CCCCAGGTTCAGAGACTGGAGCCATTACTTCAAGATCATCGAGGACCTGAGGGCTCAGATC	3'
cDNA	5'	TTGCGAAATACTGTGGACAATGCCCGCATCGTTCTGCAGATTGACAATGCCCGTCTTGCT	3'
Klon 6	5'	TTGCGAAATACTGTGGACAATGCCCGCATCGTTCTGCAGATTGACAATGCCCGTCTTGCT	3'
Klon 1	5'	TTGCGAAATACTGTGGACAATGCCCGCATCGTTCTGCAGATTGACAATGCCCGTCTTGCT	3'
Klon 5	5'	TTGCGAAATACTGTGGACAATGCCCGCATCGTTCTGCAGATTGACAATGCCCGTCTTGCT	3'
cDNA	5'	GCTGATGACTTTAGAGTCAAGTATGAGACAGAGCTGGCCATGCCCGAGTCTGTGGAGAAC	3'
Klon 6	5'	GCTGATGACTTTAGAGTCAAGTATGAGACAGAGCTGGCCATGCCCGAGTCTGTGGAGAAC	3'
Klon 1	5'	GCTGATGACTTTAGAGTCAAGTATGAGACAGAGCTGGCCATGCCCGAGTCTGTGGAGAAC	3'
Klon 5	5'	GCTGATGACTTTAGAGTCAAGTATGAGACAGAGCTGGCCATGCCCGAGTCTGTGGAGAAC	3'
cDNA	5'	GACATCCATGGGCTCCGCAAGGTCAATTGATGACACCAATATCACAGACTGCAGCTGGAG	3'
Klon 6	5'	GACATCCATGGGCTCCGCAAGGTCAATTGATGACACCAATATCACAGACTGCAGCTGGAG	3'
Klon 1	5'	GACATCCATGGGCTCCGCAAGGTCAATTGATGACACCAATATCACAGACTGCAGCTGGAG	3'
Klon 5	5'	GACATCCATGGGCTCCGCAAGGTCAATTGATGACACCAATATCACAGACTGCAGCTGGAG	3'
cDNA	5'	ACAGAGATCGAGGCTCTCAAGGAGGAGCTGCTCTTCATGAAGAAGAACCGAAGAGGAA	3'
Klon 6	5'	ACAGAGATCGAGGCTCTCAAGGAGGAGCTGCTCTTCATGAAGAAGAACCGAAGAGGAA	3'
Klon 1	5'	ACAGAGATCGAGGCTCTCAAGGAGGAGCTGCTCTTCATGAAGAAGAACCGAAGAGGAA	3'
Klon 5	5'	ACAGAGATCGAGGCTCTCAAGGAGGAGCTGCTCTTCATGAAGAAGAACCGAAGAGGAA	3'
cDNA	5'	GTAAAAGGCCTACAAGCCAGATTGCCAGCTCTGGGTTGACCGTGGAGGTAGATGCCCCC	3'
Klon 6	5'	GTAAAAGGCCTACAAGCCAGATTGCCAGCTCTGGGTTGACCGTGGAGGTAGATGCCCCC	3'
Klon 1	5'	GTAAAAGGCCTACAAGCCAGATTGCCAGCTCTGGGTTGACCGTGGAGGTAGATGCCCCC	3'
Klon 5	5'	GTAAAAGGCCTACAAGCCAGATTGCCAGCTCTGGGTTGACCGTGGAGGTAGATGCCCCC	3'
cDNA	5'	AAATCTCAGGACCTCGCCAAGATCATGGCAGACATCCGGGCCAATATGACGAGCTGGCT	3'
Klon 6	5'	AAATCTCAGGACCTCGCCAAGATCATGGCAGACATCCGGGCCAATATGACGAGCTGGCT	3'
Klon 1	5'	AAATCTCAGGACCTCGCCAAGATCATGGCAGACATCCGGGCCAATATGACGAGCTGGCT	3'
Klon 5	5'	AAATCTCAGGACCTCGCCAAGATCATGGCAGACATCCGGGCCAATATGACGAGCTGGCT	3'

Fig. 1

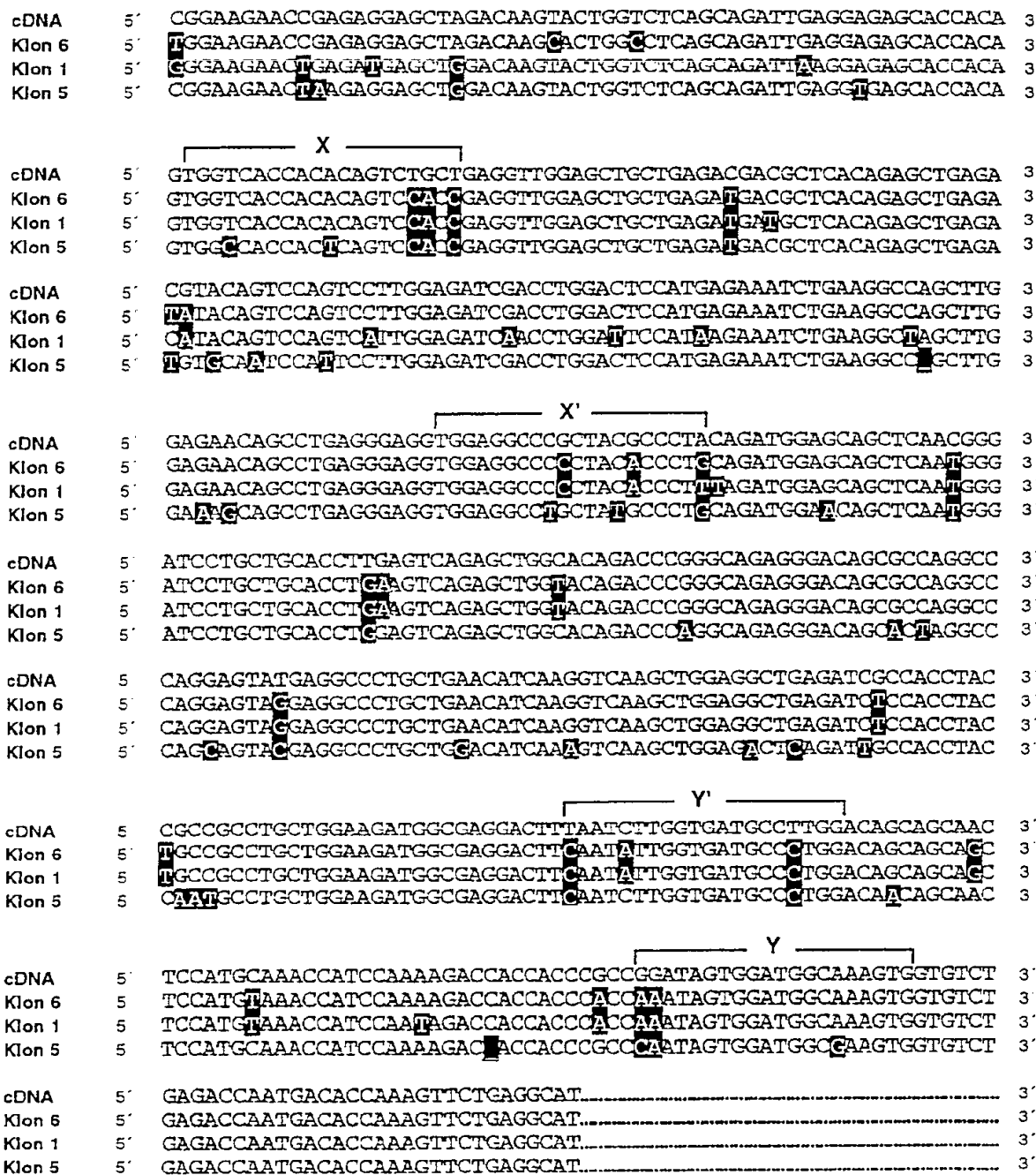


Fig. 1 - Fortsetzung

c DNA - AGTGGTCACCCACACAGTCTGCTGA-CCGGATAGTGGATGGCAAAGTGGT-

ck 18

TGCTCACCACACAGTCTGAT

GGCTAGTGGATGGCAAAGTG

"upper" Primer

"lower" Primer

ck 18

Pseudogene

Klon 1 - AGTGGTCACCCACACAGTCTGCTGA-CCGA-CCAAATAGTGGATGGCAAAGTGGT-

Klon 5 - AGTGGTCACCCACACAGTCTGCTGA-CCGA-CCAAATAGTGGATGGCAAAGTGGT-

Klon 6 - AGTGGTCACCCACACAGTCTGCTGA-CCGA-CCAAATAGTGGATGGCAAAGTGGT-

Fig. 2

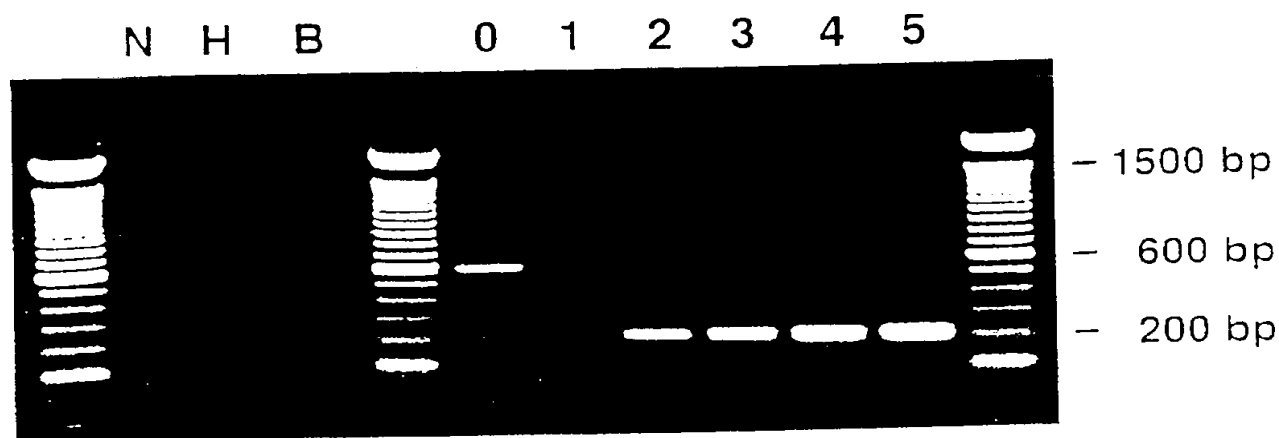


Fig. 3

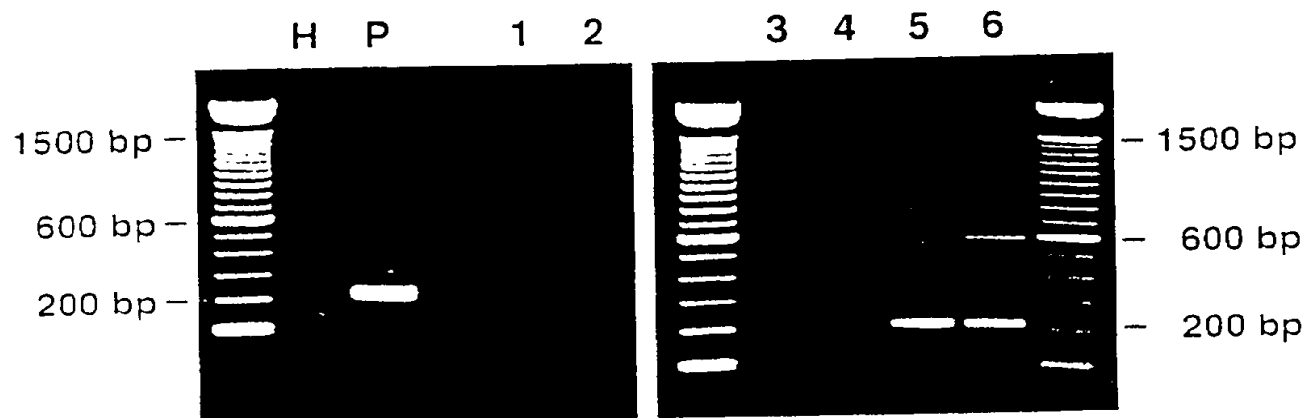


Fig. 4